

## РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ДЕЙСТВИИ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАЩЕНИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ

Д.М.Габитова<sup>\*,\*\*</sup>, И.Ф.Шайдуллов<sup>\*,\*\*</sup>, Г.И.Сабируллина<sup>\*</sup>,  
М.У.Шафигуллин<sup>\*</sup>, Ф.Г.Ситдинов<sup>\*\*</sup>, Г.Ф.Ситдикова<sup>\*</sup>

*\*Кафедра физиологии человека и животных (зав. — докт. биол. наук проф. Г.Ф.Ситдикова), \*\*кафедра охраны здоровья человека (зав. — докт. мед. наук проф. Т.Л.Зефирова) ФГАОУ ВО Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Республика Татарстан, РФ*

Исследовали роль циклических нуклеотидов во влиянии донора сероводорода ( $H_2S$ ) гидросульфида натрия ( $NaHS$ , 200 мкМ) на двигательную активность тощей кишки крысы.  $NaHS$  уменьшал спонтанные и вызванные карбахолином сокращения сегмента тощей кишки крысы, что указывает на возможное влияние  $H_2S$  через механизмы, опосредующие эффекты активации мускариновых рецепторов. На фоне мембранопроницающего негидролизуемого аналога цАМФ или в условиях блокирования аденилатциклазы ингибирующий эффект  $NaHS$  на вызванные карбахолином сокращения сохранялся. В условиях повышения уровня цГМФ или ингибирования гуанилатциклазы снижение вызванного карбахолином сокращения при действии  $NaHS$  было выражено в меньшей степени, чем в контроле. Сделано предположение о том, что  $H_2S$  оказывает релаксирующее действие на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки, действуя на мишени протеинкиназы G или путем активации синтеза цГМФ.

**Ключевые слова:** сероводород, тощая кишка, карбахолиндуцированные сокращения, цАМФ, цГМФ

Сероводород ( $H_2S$ ) был определен как новый вид газообразных посредников наряду с оксидом азота и монооксидом углерода [1,3].  $H_2S$  эндогенно синтезируется в тканях животных и человека и оказывает различные физиологические эффекты во многих системах организма [3,5,14,15]. В ЖКТ  $H_2S$  образуется с помощью ферментов цистатинин-β-синтазы и цистатинин-γ-лиазы и сульфатредуцирующими бактериями, являющимися частью нормальной энтеробактериальной флоры [7,8]. Данные о влиянии  $H_2S$  на двигательную активность ЖКТ неоднозначны: выявлено как расслабляющее, так и стимулирующее действие этого газомедиатора в разных отделах ЖКТ у разных видов животных [2,6,11,12]. Мишенями  $H_2S$  могут служить ионные

каналы, рецепторы, внутриклеточные ферментные системы [4,5,10,15], кроме того, эффекты газа могут зависеть от фосфорилирования белковых мишеней различными протеинкиназами [13].

Система циклических нуклеотидов играет важную роль в релаксации гладкомышечных клеток кишечника путем активации соответствующих протеинкиназ [9]. цАМФ и цГМФ синтезируются в ответ на выделение вазоинтестинального пептида и оксида азота соответственно. Последующая активация протеинкиназ A и G приводит к фосфорилированию различных клеточных мишеней, что вызывает десенситизацию рецепторов, ингибирование мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, снижение входящего  $Ca$ -тока и активацию K-каналов [9].

Целью данного исследования являлось определение роли системы цАМФ и цГМФ во влиянии

H<sub>2</sub>S на сокращения тонкого кишечника крысы, вызванные карбахолином.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (86/609/ЕЕС) и одобрены локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015 г.). Силу сокращений сегментов тощей кишки крысы длиной 5-7 мм в изометрических условиях регистрировали на установке "Biopac Systems Inc.", последующий анализ параметров сокращения препарата проводили с помощью программы "AcqKnowledge 4.1". В течение всего эксперимента препарат постоянно омывали раствором Кребса следующего состава: 121 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> pH 7.2-7.4, который постоянно аэрировался смесью 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, температура поддерживалась на уровне 37°C. После подвешивания препарат выдерживали в течение 60-90 мин под определенным растяжением до получения стабильных сокращений. Затем регистрировали спонтанную или вызванную карбахолином сократительную активность препарата для получения контрольных значений, после чего апплицировали интересующие нас агенты.

В качестве донора H<sub>2</sub>S использовали гидросульфид натрия (NaHS), который в водных растворах образует H<sub>2</sub>S. С учетом pH и температуры было показано, что только 11-13% исходной концентрации NaHS образует H<sub>2</sub>S в растворе [13]. Таким образом, при используемой в опытах концентрации NaHS 200 мкМ образуется 22-26 мкМ H<sub>2</sub>S, что соответствует физиологическим значениям.

В экспериментах также использовали мембранопроникающие негидролизующие аналоги цАМФ и цГМФ — 8(4-chlorophenylthio)-adenosine-3,5-cyclic monophosphat (pCPT-cAMP) и 8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3,5-cyclic monophosphat (pCPT-cGMP) соответственно, ингибитор аденилатциклазы — cisN-(2-phenylcyclopentyl) azacyclotridecl-en-amine hydrochloride (MDL-12330A), ингибитор растворимой формы гуанилатциклазы — 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), агонист рецепторов ацетилхолина — карбахолин (все вещества "Sigma"). Анализировали вызванные карбахолином (1 мкМ) сокращения, оценивая площадь под кривой (ППК) в течение 2 мин аппликации агониста. Также анализировали тоническое напряжение и амплитуду спонтанных сокращений в контроле и при добавлении исследуемых веществ.

В каждой серии использовали *n* количество животных; при этом от каждого животного получа-

ли до 4 препаратов. Достоверность различий определяли с помощью парного *t* критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние NaHS на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки.** Для стимуляции препарата использовали карбахолин (1 мкМ), вызывающий сокращение гладкомышечных клеток через активацию М-холинорецепторов [9]. Добавление карбахолина в ванночку приводило к резкому увеличению тонического напряжения от контрольного уровня, которое, достигнув максимального значения (0.80±0.13 г; *n*=4; *p*<0.05), снижалось и держалось на уровне плато (рисунок, а; табл. 1). Затем препарат отмывали и апплицировали NaHS (200 мкМ) в течение 6-10 мин. NaHS снижал амплитуду спонтанных сокращений и тонического напряжения (рисунок, а; табл. 2), как было показано ранее [12]. Последующее добавление карбахолина показало, что ППК вызванного сокращения на фоне NaHS снижалась и составляла 37±2% (0.31±0.02 г; *n*=4; *p*<0.05) от контрольного уровня (рисунок; табл. 1). После отмывки ответ препарата на карбахолин снова восстанавливался (рисунок, а; табл. 1). Таким образом, на фоне NaHS эффект карбахолина уменьшается, что свидетельствует об участии сигнальных путей, запускаемых агонистом, в эффекте газа. Известно, что эффекты H<sub>2</sub>S в различных системах могут быть связаны с изменением концентрации уровня циклических нуклеотидов [4], поэтому использовали агенты, повышающие и понижающие уровень цАМФ или цГМФ в клетке.

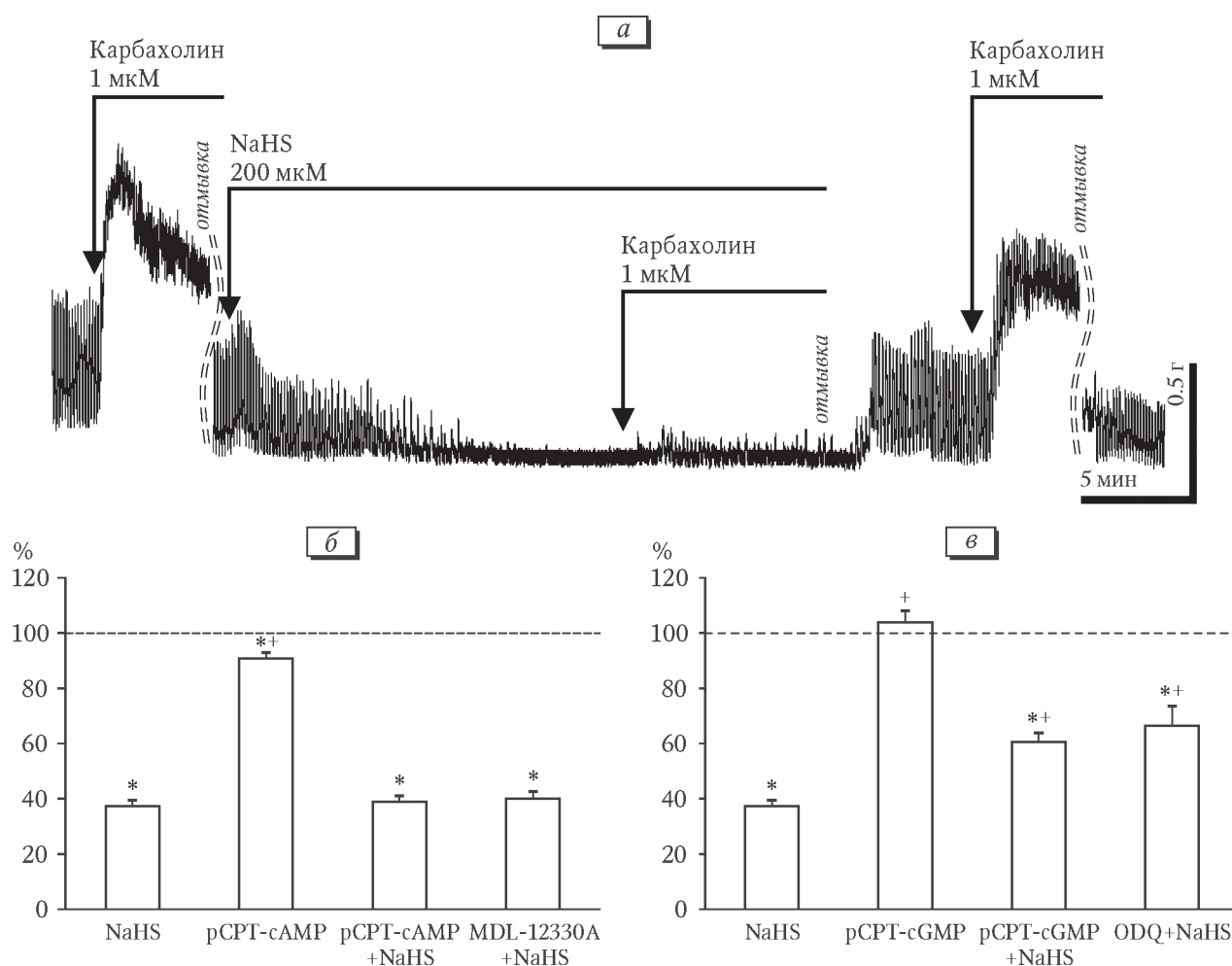
**Роль системы цАМФ в действии H<sub>2</sub>S на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки.** Аналог цАМФ pCPT-cAMP (100 мкМ) при аппликации на препарат тощей кишки вызывал снижение амплитуды спонтанных сокращений и тонического напряжения (табл. 2), что подтверждает роль цАМФ как расслабляющего агента в гладкомышечных клетках [9]. На фоне предварительной аппликации pCPT-cAMP карбахолин вызывал менее интенсивное сокращение, что отражалось в уменьшении ППК, которая составила 91±2% (*n*=3; *p*<0.05) от контрольного уровня (рисунок, б; табл. 1). На фоне одновременной аппликации pCPT-cAMP и NaHS ППК вызванного карбахолином сокращения составила 39±2% (*n*=3; *p*<0.05) от контрольного уровня, что не отличалось от действия карбахолина на фоне NaHS (рисунок, б; табл. 1).

Аденилатциклазу блокировали посредством MDL-12330A (1 мкМ). Вызванные карбахолином сокращения на фоне MDL-12330A+NaHS составили 40±3% (*n*=13; *p*<0.05) от контрольного уровня (рисунок, б; табл. 1), что также не отличалось от действия

карбахолина на фоне NaHS. Таким образом, увеличение уровня цАМФ незначительно снижало вызванные карбахолином сокращения. Однако влияние NaHS на сокращения, вызванные карбахолином в присутствии рСРТ-сАМФ или MDL-12330A, было таким же, как и при отсутствии указанных соединений. По-видимому, аденилатциклазная система не участвует в релаксирующем эффекте NaHS в тонком кишечнике крысы.

**Роль системы цГМФ в действии  $H_2S$  на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки.** цГМФ образуется в гладких мышцах в ответ на выделение оксида азота и активацию гуанилат-

циклазы. Аналог цГМФ рСРТ-сГМФ (100 мкМ) при аппликации на препарат тощей кишки вызывал уменьшение амплитуды спонтанных сокращений и тонического напряжения (табл. 2). На фоне предварительной аппликации рСРТ-сГМФ эффект карбахолина не отличался от такового в контроле и составил  $104 \pm 4\%$  ( $n=3$ ) (рисунок, в; табл. 1). Однако в условиях одновременной аппликации рСРТ-сГМФ и NaHS ППК вызванного карбахолином сокращения составила  $61 \pm 3\%$  ( $n=3$ ;  $p<0.05$ ) от контрольного уровня (рисунок, в; табл. 1) и достоверно отличалась от карбахолининдуцированного сокращения на фоне NaHS. Блокирование гуанилатциклазы



Влияние NaHS на карбахолин-вызванные сокращения препарата тощей кишки крысы.

**а** — влияние NaHS (200 мкМ) на вызванные карбахолином (1 мкМ) сокращения. Стрелка — момент подачи вещества, горизонтальная линия — длительность подачи. **б** — ППК вызванного карбахолином сокращения в условиях предварительной аппликации NaHS (200 мкМ), на фоне действия рСРТ-сАМФ (100 мкМ), рСРТ-сАМФ+NaHS, MDL-12330A (1 мкМ)+NaHS. **в** — ППК вызванного карбахолином сокращения в условиях предварительной аппликации NaHS (200 мкМ), на фоне действия рСРТ-сГМФ (100 мкМ), рСРТ-сГМФ+NaHS, ODQ (10 мкМ)+NaHS.

За 100% принята ППК вызванного карбахолином сокращения в контроле.  $p<0.05$  по сравнению со значениями \*в контроле; +на фоне действия NaHS.

**Таблица 1.** Роль циклических нуклеотидов в релаксирующем действии NaHS на вызванные карбахолином сокращения сегмента тощей кишки крысы ( $M \pm m$ )

Показатель	Эффект карбахолина	Карбахолин+NaHS	Отмывка (карбахолин)
<b>Контроль</b>			
Тоническое напряжение, г	0.80±0.13	0.31±0.02*	0.78±0.19
ППК, г×с	237.51±12.33	88.13±7.98*	218.21±5.78
<b>Добавление цАМФ</b>			
Тоническое напряжение, г	1.48±0.09	0.69±0.04*	1.57±0.12
ППК, г×с	257.10±8.91	96.65±4.98*	252.71±9.84
<b>Добавление MDL-12330A</b>			
Тоническое напряжение, г	1.18±0.13	0.75±0.07*	0.97±0.05
ППК, г×с	208.71±14.31	79.34±2.11*	205.81±18.47
<b>Добавление цГМФ</b>			
Тоническое напряжение, г	1.33±0.21	0.79±0.17*	1.14±0.29
ППК, г×с	232.14±13.46	134.07±10.14*	241.83±14.72
<b>Добавление ODQ</b>			
Тоническое напряжение, г	1.67±0.08	0.96±0.06*	1.24±0.05
ППК, г×с	185.95±17.10	115.38±10.47*	135.41±7.19

**Примечание.** \* $p < 0.05$  по сравнению со значениями, полученными при действии карбахолина в контроле и в условиях предварительной аппликации цАМФ, MDL-12330A, цГМФ и ODQ.

**Таблица 2.** Влияние NaHS и циклических нуклеотидов на амплитуду спонтанных сокращений и тоническое напряжение сегмента тощей кишки крысы ( $M \pm m$ )

Условие опыта	Амплитуда, г	Тоническое напряжение, г
Контроль	2.66±0.30	1.97±0.13
NaHS, 10 мин	1.07±0.17*	0.78±0.08*
Контроль	2.45±0.16	1.50±0.07
цАМФ, 10 мин	0.65±0.09*	0.74±0.07*
Контроль	1.24±0.11	1.55±0.13
цГМФ, 10 мин	0.91±0.09*	0.80±0.03*

**Примечание.** \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

ODQ (10 мкМ) также приводило к снижению влияния NaHS на карбахолининдуцированное сокращение (рисунок, в; табл. 1).

Таким образом ингибирующий эффект NaHS на вызванные карбахолином сокращения частично связан с активацией мишеней цГМФ или усилением синтеза цГМФ в гладкомышечных клетках. цГМФ, в свою очередь, активирует протеинкиназу G, которая имеет специфические мишени фосфорилирования, такие как рецепторы инозитол-3-фосфата, рианодиновые рецепторы, и таким образом снижает освобождение ионов кальция из внутриклеточных кальцевых депо, что оказывает влияние на релаксацию гладкомышечных клеток [9].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. 2006. Т. 92, № 7. С. 872-882.
2. Gallego D., Clavé P., Donovan J., Rahmati R., Grundy D., Jiménez M., Beyak M.J. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum // Neurogastroenterol. Motil. 2008. Vol. 20, N 12. P. 1306-1316.
3. Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology / Eds. A.Hermann, G.F.Sitdikova, T.M.Weiger. Heidelberg, 2012.
4. Gerasimova E., Lebedeva J., Yakovlev A., Zefirov A., Giniatullin R., Sitdikova G. Mechanisms of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) action on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction // Neuroscience. 2015. Vol. 303. P. 577-585.
5. Gerasimova E.V., Yakovleva O.V., Zefirov A.L., Sitdikova G.F. Role of ryanodine receptors in the effects of hydrogen sulfide on transmitter release from the frog motor nerve ending // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. Vol. 155, N 1. P. 11-13.
6. Kasparek M.S., Linden D.R., Farrugia G., Sarr M.G. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum // J. Surg. Res. 2012. Vol. 175, N 2. P. 234-242.
7. Linden D.R., Levitt M.D., Farrugia G., Szurszewski J.H. Endogenous production of H<sub>2</sub>S in the gastrointestinal tract: still in search of a physiologic function // Antioxid. Redox Signal. 2010. Vol. 12, N 9. P. 1135-1146.
8. Martin G.R., McKnight G.W., Dicay M.S., Coffin C.S., Ferraz J.G., Wallace J.L. Hydrogen sulphide synthesis

- in the rat and mouse gastrointestinal tract // *Dig. Liver Dis.* 2010. Vol. 42, N 2. P. 103-109.
9. *Murthy K.S.* Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut // *Annu. Rev. Physiol.* 2006. Vol. 68. P. 345-374.
10. *Mustafina A.N., Yakovlev A.V., Gaifullina A.Sh., Weiger T.M., Hermann A., Sitdikova G.F.* Hydrogen sulfide induces hyperpolarization and decreases the exocytosis of secretory granules of rat GH3 pituitary tumor cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 465, N 4. P. 825-831.
11. *Nagao M., Duenes J.A., Sarr M.G.* Role of hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum // *J. Gastrointest. Surg.* 2012. Vol. 16, N 2. P. 334-343.
12. *Shafigullin M.Y., Zefirov R.A., Sabirullina G.I., Zefirov A.L., Sitdikova G.F.* Effects of a hydrogen sulfide donor on spontaneous contractile activity of rat stomach and jejunum // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. Vol. 157, N 3. P. 302-306.
13. *Sitdikova G.F., Fuchs R., Kainz V., Weiger T.M., Hermann A.* Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. P. 431. doi: 10.3389/fphys.2014.00431.
14. *Sitdikova G.F., Khaertdinov N.N., Zefirov A.L.* Role of calcium and potassium channels in effects of hydrogen sulfide on frog myocardial contractility // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 151, N 2. P. 163-166.
15. *Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A.* Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells // *Pflugers Arch.* 2010. Vol. 459, N 3. P. 389-397.

Получено 17.06.16